

1/5/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007751094

WPI Acc No: 1989-016206/\*198903\*

XRAM Acc No: C89-007347

XRPX Acc No: N89-012476

**Monoclonal anti-fluorescein isothiocyanate antibodies - used as universal detection reagents in immunological detection procedures using labelled indicator reagents**

Patent Assignee: AKAD WISSENSCHAFTEN DDR (DEAK )

Inventor: BOTTGER V; JANTSCHKEFF P; KAISER G; KARAWAJEW L; MICHEEL B; SCHARTE G

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
-----------	------	------	-------------	------	------	------

DD 260132	A	19880914	DD 302094	A	19870424	198903 B
-----------	---	----------	-----------	---	----------	----------

Priority Applications (No Type Date): DD 302094 A 19870424

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

<b>DD 260132</b>	A	4			
------------------	---	---	--	--	--

Abstract (Basic): DD 260132 A

In a new method for the utilisation of monoclonal antibodies against fluorescein isothiocyanate (FITC) for immunological detection procedures, indicator reagents used for such procedures are coupled with FITC and after their use a detection or binding reaction is carried out with anti-FITC monoclonal antibodies which are in turn coupled with a label or solid carrier or which give a measurable effect by quenching the FITC fluorescence.

USE/ADVANTAGE - Anti-FITC monoclonal antibodies can be used as universal detection reagents in analytical procedures (e.g. diagnostic tests) using indicator reagents labelled with FITC. The new method can be used for the detection of antigens and antibodies in soln., for immunohistological and immunocytological tests, in protein blotting, for nucleic acid hybridisation, for cell separation, etc.

0/0

Title Terms: MONOCLONAL; ANTI; FLUORESCCEIN; ISOTHIOCYANATE; ANTIBODY; UNIVERSAL; DETECT; REAGENT; IMMUNOLOGICAL; DETECT; PROCEDURE; LABEL;

INDICATE; REAGENT

Derwent Class: B04; D15; S03

International Patent Class (Additional): A61K-039/39; C12N-005/02;



G01N-033/57  
File Segment: CPI; EPI





(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

## PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 260 132 A1

4(51) G 01 N 33/577  
A 61 K 39/395  
C 12 N 5/02

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 302 094 6

(22) 24.04.87

(44) 14.09.88

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Micheel, Burkhard, Dr. sc. nat. Dipl.-Biol., DD; Scharte, Gudrun, DD; Kaiser, Günter, Dr. rer. nat., DD;  
Jantschke, Peter, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., DD; Böttger, Volker, Dipl.-Biol., DD; Karawajew, Leonid, Dr. rer. nat.  
Bio.-Phys., SU

(54) Verfahren zur Nutzung monoklonaler Antikörper gegen FITC

(55) monoklonale Antikörper, Fluoreszeinisothiozyanat, Nutzung, immunologische Tests, Kopplungssubstanz, Indikatorreagenzien, Markierung, Marker, fester Träger, Hybridzellklon, Hinterlegung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Nutzung von monoklonalen Antikörpern (MoAk) gegen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) in immunologischen Tests. Ziel der Erfindung ist der Einsatz von MoAk gegen FITC als universelle Bindungs- und damit Nachweisreagenzien in den verschiedensten immunologischen Verfahren. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß als einheitliche Kopplungssubstanz FITC für die Markierung der in immunologischen Nachweisverfahren verwendeten Indikatorreagenzien eingesetzt wird. Der Nachweis bzw. die Bindung erfolgt dann durch den Einsatz von MoAk gegen FITC, die mit einem in hochsensitiven Immuntests verwendeten Marker (Radioisotop, Enzym, usw.) oder auch festen Trägern gekoppelt sind. Für die Nachweisreaktionen wurden die durch die Hybridzellklone B13-AF9 und B13-DE1 produzierten MoAk gegen FITC verwendet, die im Zentralinstitut für Molekularbiologie (Liste 1986) unter den Nummern DDR 0108 bzw. DDR 0109 hinterlegt wurden. Anwendungsgebiet der Erfindung sind die verschiedensten Gebiete der Biowissenschaften, einschließlich der Medizin.

## Patentanspruch:

1. Verfahren zur Nutzung von monoklonalen Antikörpern (MoAk) gegen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) für immunologische Nachweisverfahren, **gekennzeichnet dadurch**, daß die für derartige Verfahren eingesetzten Indikatorreagenzien mit FITC gekoppelt werden und daß nach Einsatz der FITC-gekoppelten Reagenzien ein Nachweis bzw. eine Bindung durch MoAk gegen FITC erfolgt, die ihrerseits mit einem Marker bzw. festen Träger gekoppelt sind oder durch die Löschung der FITC-Fluoreszenz einen meßbaren Effekt hervorrufen.
2. Verfahren zur Nutzung von monoklonalen Antikörpern (MoAk) gegen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) für immunologische Nachweisverfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die MoAk gegen FITC von den Hybridzellklonen B13-AF9 (ZIM-Liste 1986: DDR Nr. 0108) und B13-DE1 (ZIM-Liste 1986: DDR Nr. 0109) produziert werden.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Nutzung von monoklonalen Antikörpern (MoAk) gegen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) in immunologischen Tests.

Anwendungsgebiet der Erfindung sind die verschiedensten Gebiete der Biowissenschaften, einschließlich der Medizin.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Hochempfindliche immunologische Nachweisverfahren beruhen auf der spezifischen Erkennung der nachzuweisenden Substanz durch Antikörper. Voraussetzung ist die Markierung der Indikatorreagenzien mit einer Substanz, die noch in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar ist. Die wichtigsten Markierungssubstanzen für hochempfindliche Immuntests sind Radioisotope, Enzyme, Fluoreszenzmarker oder Lumineszenzmarker. Die Sensitivität eines Immuntests hängt neben der Bindungsstärke der verwendeten Antikörper auch von der Effektivität der Kopplung der Markierungssubstanzen ab, die für verschiedene Proteinmoleküle, einschließlich Antikörper unterschiedlich sein kann. Aus diesem Grunde muß für jeden Immuntest eine optimale Markierungsmethode der Nachweisreagenzien erarbeitet werden, und für verschiedene Immuntests liegen demzufolge auch die verschiedensten markierten Reagenzien vor.

Fast alle Proteine, einschließlich der Antikörper lassen sich verhältnismäßig leicht mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markieren, ohne daß die biologische Aktivität der Proteinmoleküle ernstlich beeinträchtigt wird. Diese Eigenschaft wird seit langem in der Immunhistologie durch den Einsatz FITC-markierter Antikörper und der Auswertung der Tests unter dem Fluoreszenzmikroskop genutzt. Für eine generelle Nutzung in hochsensitiven Fluoroimmuntests erwies sich FITC jedoch als bedingt geeignet.

Die leichte Markierbarkeit von Proteinen mit FITC und die Möglichkeit der Herstellung von Antikörpern gegen FITC wurden in ersten Experimenten für Zelltrennungungsverfahren und für immunhistologische Nachweise ausgenutzt. Dabei wurden für die Zelltrennung polyklonale (BARAN, M. M. et al., J. Immunol. Meth. 53, 321, 1982) und für die Immunhistologie monoklonale Anti-FITC-Antikörper (HAAIJMAN, J. J. et al., 84, 363, 1986) eingesetzt.

## Ziele der Erfindung

Ziel der Erfindung ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) als universelle Bindungs- und damit Nachweisreagenzien in den verschiedensten immunologischen Verfahren.

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, monoklonale Antikörper gegen FITC als Nachweisreagenzien in den verschiedensten immunologischen Verfahren zu nutzen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Nutzung monoklonaler Antikörper gegen FITC ist dadurch gekennzeichnet, daß die in einem immunologischen Test verwendeten Indikatorproteine (Antikörper, Antigene, etc.) mit FITC markiert werden und daß die FITC-markierten Proteine nach Einsatz in den entsprechenden Tests mit den monoklonalen Antikörpern gegen FITC nachgewiesen werden, die ihrerseits mit einer noch in geringer Konzentration nachweisbaren Markierungssubstanz, wie z. B. Radioisotopen, Enzymen etc. gekoppelt sind. Da FITC leicht an unterschiedliche Proteine koppelbar ist, können z. B. Radioisotop- oder Enzym-markierte monoklonale Anti-FITC-Antikörper als universelle Reagenzien für die unterschiedlichsten immunologischen Tests genutzt werden.

Die Kopplung mit FITC und der Einsatz von Anti-FITC-Antikörpern kann demzufolge zum Nachweis von Antigenen und Antikörpern in Lösung, für immunhistologische und -zytologische Tests, als Nachweisreaktionen beim Proteinblotting, zur Nukleinsäurehybridisierung, zur Zelltrennung etc. eingesetzt werden. Da die Anti-FITC-Antikörper die Fluoreszenz des FITC löschen, ist auch auf dieser Basis eine Testentwicklung möglich.

Die für die erfindungsgemäße Nutzung eingesetzten monoklonalen Anti-FITC-Antikörper wurden von den Hybridzellklonen

B13-DE1 und B13-AF9 gewonnen, die im Zentralinstitut für Molekularbiologie (ZIM-Liste 1986) unter den Nummern DDR 0109 bzw. DDR 0108 hinterlegt wurden.  
Die Erfindung soll nachstehend an 3 Ausführungsbeispielen erläutert werden.

### Ausführungsbeispiele

#### 1. Monoklonale Antikörper gegen Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Für die Verfahren wurden spezifische monoklonale Antikörper gegen FITC eingesetzt, die durch die Klone B13-DE1 (ZIM-Liste 1986 Nr. DDR 0109,) und B13-AF9 (ZIM-Liste 1986 Nr. DDR 0108) produziert werden. Die Antikörper wurden aus der Aszitesflüssigkeit durch Ammoniumsulfatpräzipitation angereichert bzw. über Hydroxylapatit gereinigt. Als Markierungssubstanz für die Antikörper wurde in vorliegenden Beispielen  $^{125}\text{J}$  benutzt, so daß die Auswertung auf der Basis von Radioimmuntests erfolgte.

#### 2. Markierung der verwendeten Proteine mit FITC

Die Markierung mit FITC ist eine Standardmethode, die in vorliegenden Beispielen entsprechend der Beschreibung von M. M. GANI, et al. (J. Immunol. Meth. **34**, 133, 1980) durchgeführt wurde.

#### 3. Angewendete Nachweisverfahren

##### a) Antikörpernachweis

Ein sensitiver radioimmunologischer Nachweis von Antikörpern, einschließlich von monoklonalen Antikörpern kann mit Hilfe von Festphasen-Radioimmuntests nach folgendem Inkubationsschema durchgeführt werden:

Gereinigte Anti-Immunglobulin (Ig)-Antikörper werden an Polyvinylchlorid (Tablettenblisters) adsorbiert, nach Waschen unter Leitungswasser erfolgt die Inkubation mit den nachzuweisenden Antikörpern und (nach weiterem Waschen) im letzten Schritt mit dem entsprechend  $^{125}\text{J}$ -markierten Antigen (B. MICHEEL, et al., J. Immunol. Meth. **46**, 41, 1981). Bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen FITC erfolgt an Stelle der Inkubation mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem Antigen eine Inkubation mit FITC-markiertem Antigen und nachfolgend mit  $^{125}\text{J}$ -markierten Anti-FITC-Antikörpern. Ein Vergleich beider Methoden ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** Nachweis der Reaktivität von monoklonalen Anti-HCG<sup>1)</sup>-Antikörpern<sup>2)</sup> in zwei Festphasen-Radioimmuntests

Antikörperverdünnung	Bindung von Radioaktivität an fester Phase <sup>3)</sup>	
	Methode 1 <sup>4)</sup>	Methode 2 <sup>5)</sup>
$10^{-1}$	5906	5844
$10^{-2}$	5682	6598
$10^{-3}$	5934	6189
$10^{-4}$	6112	5997
$10^{-5}$	5209	5166
$10^{-6}$	4089	5731
$10^{-7}$	2363	2046
$10^{-8}$	1116	1318
$10^{-9}$	754	937
$10^{-10}$	700	793

1) HCG = humanes Choriogonadotropin

2) Es werden die vom Hybridzellklon B9-AB9 (ZIM-Liste 1986, Nr. DDR 0107, WP 244 564) produzierten monoklonalen Antikörper eingesetzt

3) Werte in c. p. m. (counts per minute)

4) Inkubationsreihenfolge: Ziege-Anti-Maus Ig, MoAk gegen HCG,  $^{125}\text{J}$ -HCG

5) Inkubationsreihenfolge: Ziege-Anti-Maus Ig, MoAk gegen HCG, FITC-HCG,  $^{125}\text{J}$ -MoAk gegen FITC (zur Vermeidung unerwünschter Bindungen wurde dem Verdünnungspuffer der letzten MoAk normales Mausserum in einer Konzentration von 1 % zugesetzt)

Beide Methoden zeigen die gleiche Nachweisgrenze. Die  $^{125}\text{J}$ -markierten Anti-FITC-Antikörper konnten mit gleichem Ergebnis für eine Reihe weiterer Antigen-Antikörpersysteme eingesetzt werden.

##### b) Antigennachweis

Der Nachweis von Antigenen in wäßrigen Lösungen wurde auf der Basis von Zwei-Seiten-Bindungstests (Sandwich-Tests) durchgeführt. Derartige Tests beruhen darauf, daß ein Antikörper an eine feste Phase gebunden wird, darauf erfolgt die Inkubation mit der zu untersuchenden Probe und im letzten Schritt mit markierten Antikörpern. Der Einsatz von monoklonalen Anti-FITC-Antikörpern erfolgte in einem Testsystem zum Nachweis von HCG in einer Standardlösung. Folgende Inkubationssequenz wurde durchgeführt: Adsorption von MoAk gegen HCG produziert vom Hybridzellklon B9-AB9, ZIM-Liste 1986, Nr. DDR 0107, WP 244 564 an Polyvinylchlorid, HCG-Standardlösung in verschiedenen Verdünnungen, FITC-markierte MoAk gegen HCG produziert vom Klon B9-BA8, ZIM-Liste 1986, Nr. DDR 0104, Patentanmeldung WP 244 565  $^{125}\text{J}$ -markierte MoAk gegen FITC.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.





**Tabell 2:** Nachweis von HCG in einer Standardlösung in einem Zwei-Seiten-Bindungstest mit MoAk gegen HCG und einem MoAk gegen FITC

Verdünnung der Standardlösung <sup>1)</sup>	Bindung von Radioaktivität an der festen Phase <sup>2)</sup>
1:10	13 747 ± 4 294
1:20	10 696 ± 1 497
1:40	5 896 ± 653
1:80	3 599 ± 272
1:160	1 965 ± 195
1:320	1 542 ± 158
1:640	1 240 ± 81
1:1 280	1 119 ± 78
1:2 560	1 094 ± 52
1:5 120	1 116 ± 25

1) Standardlösung enthielt 1 IU/ml

2) Werte in c.p.m. (counts per minute), Mittelwerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist, liegt die Sensitivitätsgrenze des Tests unter 10 mIU/ml (das würde der Verdünnungsstufe 1:100 entsprechen). Der Test entspricht damit dem internationalen Standard für hochsensitive HCG-Nachweisverfahren. Die <sup>125</sup>J-markierten Anti-FITC-Antikörper konnten mit ähnlichen Resultaten für andere Antigenbestimmungen eingesetzt werden.

**c) Nutzung in der Immunzytologie**

Der Nachweis von Antigenen auf Zellen wurde auf der Basis eines indirekten Radioimmunbindungstests durchgeführt. Derartige Tests beruhen darauf, daß Zellen mit einem Antigen-spezifischen Antikörper inkubiert werden und in einem zweiten Schritt die Bindung des Antikörpers an die Zellen durch einen markierten Anti-Antikörper nachgewiesen wird.

In konventionellen Tests wird zum Nachweis des gebundenen Antigen-spezifischen Antikörpers ein Anti-Immunglobulin-Antikörper einer anderen Spezies eingesetzt. Der Einsatz von Anti-FITC-Antikörpern erfolgte in einem Testsystem zum Nachweis von karzinoembryonalem Antigen (CEA) auf Zellen. Dabei wurde die Effektivität des Nachweises durch <sup>125</sup>J-markierte Anti-FITC-Antikörper mit der konventionellen Nachweismethode durch <sup>125</sup>J-markierte Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper verglichen.

**Folgende Versuchsanordnung wurde gewählt:**

**Methode 1:** Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie LS 174 inkubiert mit FITC-markierten MoAk gegen CEA, die vom Hybridzellklon D14-HD11 (ZIM-Liste 1986, Nr. DDR 0103, produziert wurden, waschen, danach Inkubation mit <sup>125</sup>J-markierten Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpern.

**Methode 2:** Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie LS 174 inkubiert mit FITC-markierten MoAk gegen CEA, die vom Hybridzellklon D14-HD11 (ZIM-Liste 1986, Nr. DDR 0103, produziert wurden, waschen, danach Inkubation <sup>125</sup>J-markierten MoAk gegen FITC.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3:** Nachweis von CEA auf Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie LS 174 im Radioimmunbindungstest mit Hilfe von MoAk gegen CEA und <sup>125</sup>J-markierten Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpern bzw. <sup>125</sup>J-markierten MoAk gegen FITC

Verdünnung der FITC-markierten MoAk gegen CEA	Methode 1 ( <sup>125</sup> J-Anti-Maus-Immunglobulin)	Methode 2 ( <sup>125</sup> J-MoAk gegen FITC)
1:6 400	3 120 <sup>1)</sup>	12 163
1:12 800	2 925	8 699
1:25 600	2 461	5 451
1:51 200	1 105	2 040
1:102 400	450	1 010
Kontrolle	325	850

1) Werte in c.p.m. (counts per minute).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Nachweisgrenze mit beiden Methoden vergleichbar ist. Sie liegt bei der Antikörperverdünnung 1:51 200. Die quantitativen Unterschiede in den Meßwerten sind wahrscheinlich auf Unterschiede in der <sup>125</sup>J-Markierung zurückzuführen.

Die Methode konnte auch auf andere Testsysteme übertragen werden. Sie bietet besondere Vorteile bei Arbeiten, die im konventionellen Versuchsansatz zu unerwünschten Kreuzreaktionen führen (wie z.B. in autologen oder allogenen Systemen).

